

高速液体クロマトグラフィーを用いた梅干し中の有機酸及び
アミグダリン関連物質の一斉検出とその抗菌作用
健康管理学部 健康栄養学科 岩崎啓子

High-performance liquid chromatography (HPLC) for the simultaneous detection of organic acids and amygdalin-related compounds in pickled Japanese apricot (*umeboshi*) and evaluation of the antibacterial effects of these components

Dept. of Health and Nutrition, Faculty of Health Management Keiko IWASAKI

Abstract

Japanese apricot (*Prunus mume*) has traditionally been consumed in processed forms such as dried and/or salted products, including *umeboshi*. This processed food contains not only various types of organic acid with multifunctional bioactivities, but also a toxic cyanogenic glycoside, amygdalin. We developed and validated a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous quantification of organic acids and amygdalin-related compounds in *umeboshi*. This method facilitated the detection of all components of interest about 30 min. In addition, the method showed good recoveries of spiked samples and minimal inter-assay variations. Based on the compositional data obtained from HPLC analysis, we examined the antibacterial activities of these components and found that the synergistic effects of citric acid, a major organic acid, and other organic acids may be responsible for the antibacterial properties of *umeboshi*.

Key words : high-performance liquid chromatography(HPLC), pickled Japanese apricot, organic acid, antibacterial activity

【要旨】梅 (*Prunus mume*) は、乾燥や塩漬等の処理を行うことで古くから食用とされている。梅の加工食品の一つである梅干しには、多彩な生理活性作用を示す種々の有機酸が含まれているが、有毒成分であるアミグダリン (AM) 等の青酸配糖体も含まれている。本研究では、はじめに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて梅干し中に含まれる有機酸及び、有毒成分である AM 関連物質の同時定量法について検討した。その結果、全ての測定対象成分を約 30 分間で検出し、さらに、添加回収率、測定間の変動率共に良好な値を示す迅速性に優れた分析法を確立した。次に、HPLC 分析で得られた梅干しの各成分量をもとに、抗菌作用成分について検討した結果、梅干しの抗菌作用は、主な有機酸であるクエン酸と他の有機酸等との相乗効果により発現されることが示唆された。

キーワード：高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、梅干し、有機酸、抗菌作用

【目的】梅干しは、多彩な生理活性作用を有する種々の有機酸を含有する。一方で、青酸配糖体であるアミグダリン (AM) やその分解物であるベンズアルデヒド (BAL)、ベンジルアルコール (BeOH) も含有しており、BAL の酸化物である安息香酸 (BA) とともに静菌作用を有する。

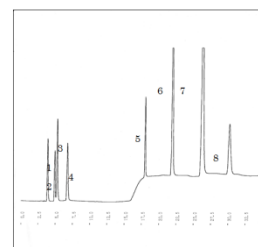
AM は、未熟果実に含有量が高く、分解されると青酸配糖体毒性の主な原因成分であるシアン化水素を生成する。梅に含まれる AM は、果実の成熟および加工処理により無毒化されるが、加工工程の違い等により AM が残存することが報告されており、その挙動に興味を持たれる。そこ

で本研究では、梅干しに含まれる有機酸及び AM 関連化合物の HPLC を用いた同時定量法について検討した。さらに、得られた梅干しの各成分量をもとに主要な抗菌作用成分について検討した。

【方法】

1.HPLC 条件

分離カラムは、TSK gel ODS-100s を 2 本接続して用い、検出波長は 210 nm、カラム温度は室温とした。移動相は、0.1%リン酸-メタノール (9 : 1、V/V、溶離液 A) 及び 0.1%リン酸-メタノール (6 : 4、V/V、溶離液 B) を用いた。流速は 1 ml/分とし、開始から 10 分間は溶離液 A を 100%送液し、その後、溶離液 B にかえ、更に 25 分間この状態を保った。検出成分は、クエン酸、リンゴ酸、酢酸、AM、BeOH、BAL 及び BA の 7 成分とした。



【標準原液のHPLCクロマトグラム】

1:DL-malic acid (450 mg/ml), 2:acetic acid (1000 mg/ml),
3:citric acid (1000 mg/ml), 4:fumaric acid (550 mg/ml),
5:amygdalin(50 mg/ml), 6:benzylalcohol(50 mg/ml),
7:benzaldehyde(50 mg/ml), 8:benzoic acid (50 mg/ml).

2.抗菌作用及び短時間殺菌作用の測定

抗菌作用の測定は、被験菌液を HI 寒天培地上に全面塗抹し、寒天培地上に各調製溶液をペーパーディスクに浸み込ませたもの及び梅干し果肉 1 g を置き、形成された阻止円をもとに抗菌作用を判定した。短時間殺菌作用の測定は、各々の溶液に被験菌液を加え、0、10、30 及び 60 分間後に各溶液から 200 μ l ずつ滅菌生理食塩水に接種し、段階希釈液を調製した。この溶液から 100 μ l ずつ HI 寒天培地上に接種、全面塗抹したものを 37℃24 時間培養し、生菌数を測定した。

【結果】 HPLC による同時定量法について検討した結果、約 30 分間で梅干しに含まれる 7 成分の同時定量法を確立した。クエン酸、リンゴ酸、酢酸、AM、BeOH、BAL 及び BA の検出限界 (S/N 比) は、各々 5.37 μ g/ml、8.33 μ g/ml、4.40 μ g/ml、0.30 μ g/ml、0.08 μ g/ml、0.05 μ g/ml 及び 0.18 μ g/ml であった。また、測定間の変動率は 1.3~3.7 %、添加回収率は 84.7 %~105.6 % と良好な結果が得られた。梅干中の各成分を定量した結果、3 種の有機酸は、全ての試料から検出された。また、全ての試料から微量ではあるが AM が検出された。HPLC により検出されたクエン酸、リンゴ酸、酢酸はいずれも抗菌作用を示したが、これら 3 種の有機酸においては、酢酸が強い抗菌作用を示した。しかし、梅干し中の有機酸含有量に調整した溶液では、クエン酸溶液のみが抗菌作用及び短時間殺菌作用を示した。また、有機酸 3 種混合溶液、有機酸 3 種混合溶液に食塩を添加した溶液、梅果肉においても抗菌作用及び短時間殺菌作用が認められた。

【考察】 本研究で確立した梅干し中の有機酸及び AM 関連化合物の同時定量法は、約 30 分間で測定対象成分を良好に分離・検出することが可能となり、実試料への応用が可能であった。また、全ての試料から AM が検出されたが、検出された AM 含有量では健康への影響はないものと推察された。HPLC 分析により梅干しの主要な有機酸は、クエン酸であることを明らかにした。クエン酸、リンゴ酸及び酢酸の抗菌作用を測定した結果、3 種の有機酸ともに抗菌作用を示したが、AM 関連物質では梅干し中含量は抗菌作用を示さなかった。有機酸の中では酢酸が強い抗菌作用を有していたが、含有量は少なく、その含有量では抗菌作用は示さなかった。梅干し中で含有量が最も多い有機酸はクエン酸であり、その含有量に調整したクエン酸溶液でのみ単独で強い抗菌作用を示したことから、梅干しの抗菌作用の主たる成分はクエン酸であること、さらに他の有機酸等との相乗効果によって、梅干しの抗菌作用が発現していることが示唆された。